

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Mgr. Bc. Adéla Lohonková

Alergický stav matky nemá vliv na odpověď novorozeneckého imunitního systému na stimulaci
alergeny (*in vitro*)

Maternal Allergy Status Has No Impact on Neonatal Immune Responses to Allergen Stimuli

Rigorózní práce

Vedoucí práce: RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.

Praha, 2020

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli za dlouholetou spolupráci a neochvějnou trpělivost. Mé díky patří též mé rodině za podporu při všech životních rozhodnutích.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Na vědeckém článku, na kterém je tato práce založena, jsem se podílela provedením experimentů, následnou analýzou výsledků a konečně samotným sepsáním manuskriptu.

V Praze dne

Adéla Lohonková

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	4
ABSTRAKT.....	5
ABSTRACT.....	6
ÚVOD	7
ALERGICKÝ STAV MATKY NEMÁ VLIV NA ODPOVĚĎ NOVOROZENECKÉHO IMUNITNÍHO SYSTÉMU NA STIMULACI ALERGENY (<i>IN VITRO</i>).....	12
ZÁVĚR	15
LITERATURA.....	16
PŘÍLOHY	22

SEZNAM ZKRATEK

- APC buňka předkládající antigen (antigen-presenting cell)
- CBMC mononukleární buňky pupečnickové krve (cord blood mononuclear cells)
- DC dendritická buňka (dendritic cell)
- ELISA imunoenzymatická esej (enzyme-linked immuno sorbent assay)
- GM-CSF faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (granulocyte macrophage colony-stimulating factor)
- IFN- γ interferon gama (interferon gamma)
- IgM/E/D imunoglobulin třídy M/E/D
- ILC2 přirozená lymfoidní buňka druhého typu (innate lymphoid cell type 2)
- LPS lipopolysacharid
- MHC hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
- OVA ovalbumin
- PAF faktor aktivující krevní destičky (platelet-activation factor)
- MAMP molekulární vzory asociované s mikroby (microbe-associated molecular pattern)
- PHA fytohemagglutinin
- qRT-PCR kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (quantitative real-time polymerase chain reaction)
- SRS-A pomalu reagující substance anafylaxe (slow reacting substance of anaphylaxis)
- TCR receptor T lymfocytu (T-cell receptor)
- TGF- β transformující růstový faktor beta (transforming growth factor beta)
- TLR receptor přirozené imunity (toll like receptor)
- TNF- α faktor nekrotizující nádory alfa (tumor-necrosis factor alpha)
- Treg T regulační buňky

ABSTRAKT

Alarmující vzrůstající incidence alergických onemocnění vede ke snaze odhalit skupinu znaků s prognostickým potenciálem poukazujícím na zvýšené riziko rozvoje alergie v pozdějším věku. Identifikace takového znaku nebo skupiny znaků poukazujících na vyšší riziko vzniku alergie by umožnilo včasné zavedení preventivních opatření vedoucích k zabránění rozvoje vlastního alergického onemocnění. Pupečnicková krev se jeví jako ideální biologický materiál pro hledání prognostických znaků poukazujících na zvýšené riziko rozvoje alergických onemocnění. Schopnost buněk pupečnickové krve reagovat na stimulaci běžnými alergeny produkcí cytokinů podle určitého vzoru závislého na alergickém statutu matky by mohla být tím hledaným předpovědním znakem. Prezentovaná studie se zaměřuje na stanovení cytokinů typických pro Th1- : interferon gama (IFN- γ), Th2- : interleukin 5, interleukin 13 (IL-5, IL-13) a regulační T buňky (Treg): interleukin 10 (IL-10) imunitní odpovědi na úrovni genové exprese pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qRT-PCR) následované stanovením samotné produkce cytokinů buňkami pupečnickové krve v supernatantu buněčných kultur. Novorozenci byli rozděleni do dvou skupin dle alergického stavu jejich matek: děti zdravých matek (novorozenci s relativně nízkým rizikem rozvoje alergie) a novorozenci alergických matek (dětí s relativně vyšším rizikem vzniku alergie). Buňky pupečnickové krve byly stimulovány běžnými alergeny: ovalbuminem, roztočem, bojínkem a břízou. Ani na jedné sledované úrovni tvorby cytokinů (mRNA, vlastní protein sekretovaný buňkami) buňkami pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi těmito dvěma skupinami. Tento výsledek poukazuje na fakt, že rané postnatální vlivy budou hrát při rozhodování o budoucím vzniku alergie nejspíše větší roli než případná prenatální senzibilizace alergeny *in utero*.

Klíčová slova: alergie, pupečnicková krev, alergeny, cytokiny, ELISA, kvantitativní PCR v reálném čase

ABSTRACT

The alarming increasing incidence of allergic diseases leads to the effort to identify the group of markers with prognostic potential pointing reliably to an allergy development at a later age. Identification of such marker or a group of markers pointing to a higher risk of developing an allergy would allow early implementation of preventive measures to block further development of the allergic disease. Umbilical cord blood appears to be the ideal biological material for the search for prognostic markers that are suitable for further study. The ability of umbilical cord blood cells to respond to stimulation by common allergens by producing cytokines according to a pattern dependent on the allergic status of the mother could be the predictive feature sought. The presented study focuses on the determination of cytokines typical for Th1-: interferon gamma (IFN- γ), Th2-: interleukin 5, interleukin 13 (IL-5, IL-13) a regulatory T cells (Tregs): interleukin 10 (IL-10) immunity responses at the level of gene expression by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) followed by determination of the protein production itself in the cell culture supernatant. Newborns were divided into two groups according to the allergic status of their mothers: children of healthy mothers (newborns with a relatively low risk of developing allergies) and newborns of allergic mothers (children with a relatively higher risk of allergies). Umbilical cord blood cells were stimulated with common allergens: ovalbumin, house dust mite, timothy grass and birch. No significant difference was found between the two groups at either level of cytokine production (mRNA, protein secreted by cells) by umbilical cord blood cells from children of healthy and allergic mothers. This result points to the fact that early postnatal influences are likely to play a greater role in deciding on the future development of allergies than possible prenatal sensitization by allergens *in utero*.

Key words: allergy, cord blood, allergens, cytokines, ELISA, quantitative real-time PCR

ÚVOD

Slovo alergie pochází z řeckého „allos ergos“, což se překládá jako „jiná reakce“, a bylo představeno v roce 1906 rakouským pediatrem Clemensem von Pirquetem. Jeho cílem bylo poskytnout světu pojem, který by charakterizoval změněnou reaktivitu imunitního systému stojící za vznikem alergií. Imunitní systém jedince predisponovaného k rozvoji alergie reaguje neadekvátně na relativně neškodný antigen zevního prostředí. V té době alergie zahrnovala anafylaxi, imunitní odpověď proti patogenům, sérovou nemoc a ostatní hypersenzitivní reakce. (Silverstein 2001)

Alergie je onemocnění spojené s moderní dobou a společností. Původně bylo považováno za vzácný vedlejší efekt rozvoje civilizovaného západního světa. Do konce dvacátého století si ale alergie získala pozornost odborné veřejnosti a byla přehodnocena jako velmi rozšířené potenciálně fatální onemocnění. Studium mechanismů vzniku, genetického pozadí, projevů vlastního onemocnění a možné lékařské intervence se začala zabývat vědecká obec a to dále podnítilo vznik nových klinických specializací, diagnostických metod a terapeutických přístupů.

Na přelomu 20. a 21. století se alergie stala jedním z představitelů civilizačních onemocnění reflektujících zhoršenou kvalitu životního prostředí a zrychlený životní styl zahrnující ve velké míře stres, který není možné jednoduše eliminovat, protože nevychází z fyzické hrozby, ale tlaku prostředí na omezení životního komfortu jedince. Vzhledem k neustále narůstající incidenci tohoto typu onemocnění se vědci, epidemiologové a lékaři chopili hozené rukavice a přinesli veřejnosti mnoho nových poznatků ohledně etiologie a patogeneze alergických onemocnění. Známa je nyní nejen historie, genetika, geografické rozšíření, ale i podstata imunologických dějů reprezentovaná buněčným i intracelulárními mechanismy. Toto jde samozřejmě ruku v ruce s obchodní stránkou věci, kdy se farmaceutické firmy předhánějí v produkci přípravků zmírňujících příznaky onemocnění, jejichž spotřeba stoupá. Tento rostoucí trh je ukazatelem mediálního zájmu a celkové závažnosti situace kolem alergických onemocnění, která bývá nazývána „moderním morem“. (Jackson 2001)

Alergie je definována jako přecitlivělost časného typu zprostředkovaná protilátkami izotypu IgE tvořenými v odpovědi na alergeny vnímavými jedinci (dle Philipa Gella a Robina Coombse hypersenzitivita I. typu). Alergeny jsou pak označovány neškodné exoantigeny rozpoznatelné imunitním systémem, schopné spustit signalizační kaskádu vedoucí k alergické reakci. První kontakt s alergenem se nazývá senzibilizace imunitního systému.

Při senzibilizaci dochází ke vstupu alergenu do těla zejména přes slizniční povrchy, kůži nebo krevní cestou (například hmyzí jedy). Ten je dále zpracován buňkami předkládajícími antigen (APC), mezi které patří monocyty, makrofágy, dendritické buňky, B buňky a bazofilní

granulocyty (Sokol *et al.* 2009). APC pak zahajují primární imunitní odpověď (Morelli *et al.* 2004): v endozómu procesem ubiquitinylatione rozloží alergen na kratší úseky, čímž odhalí jeho antigenní determinanty nebo epitopy (Wang and Maldonado 2006). Rozštěpený alergen je následně vystaven v komplexu s hlavním histokompatibilním komplexem (MHC) II. třídy na povrchu APC a prezentován naivním CD4⁺ T buňkám. U atopických jedinců dochází po rozpoznání antigenu za současné přítomnosti kostimulačních molekul na APC k indukci přeměny naivních T lymfocytů na aktivované CD4⁺ Th2 buňky. Jako třetí určující signál působí na determinaci imunitní odpovědi cytokinové mikroprostředí v imunologické synapsi, které přispívá k rozhodování, jakým směrem se bude imunitní odpověď ubírat: IL-12 podporuje indukci Th1, IL-4 iniciuje vznik Th2, zatímco zvýšené koncentrace IL-2 a transformujícího růstového faktoru beta (TGF-β) vedou ke vzniku Treg, IL-6 a TGF-β upřednostňuje vývoj Th17. U zdravých jedinců by imunitní systém preferenčně inicioval vznik imunitní odpovědi Th1, která je jednou z možných reakcí na běžné bakteriální antigeny. Tento rozdíl je klíčovým krokem pro rozvoj alergické reakce. Efektorové T lymfocyty následně produkují cytokiny typické pro Th2 imunitní odpověď (IL-4, IL-13), a tím nastavují prostředí pro další rozvoj alergické reakce. Ta vede přes proliferaci B buněk, které jsou zodpovědné za produkci protilátek. B buňky pod vlivem cytokinového prostředí nastaveného v předchozích krocích reakce a interakcí CD40 (B buňky) s CD40L (Th2 buňky) prodělávají izotypový přesmyk a mění se v B buňky (plazmatické buňky) produkující vysoce specifické protilátky izotypu IgE (Lorenz *et al.* 1995). Z některých stimulovaných B buněk se v dlouhodobém horizontu stávají paměťové buňky. (Kaiko *et al.* 2008)

Při každém dalším setkání s alergenem dochází k jeho vazbě na specifické IgE. Tato protilátka se ještě před kontaktem s alergenem váže na několik možných typů receptorů: vysokoafinní FcεRI, nízkoafinní FcεRII (CD23) a galektin-3 (Yamaoka *et al.* 1995; Gould and Sutton 2008), se kterými vytváří komplex. Tyto receptory se nacházejí na žírných buňkách, bazofilech, eozinofilech, epidermálních Langerhansových buňkách a neutrofilech. Jejich provázáním dochází k aktivaci signální kaskády vedoucí k uvolnění Ca²⁺ z intracelulárních depositů, degranulaci žírných buněk nebo bazofilů a uvolnění primárních mediátorů alergické reakce (Hübner *et al.* 2011). Tato reakce je velmi rychlá, k manifestaci prvních příznaků dochází do několika minut po setkání s alergenem.

Primárními mediátory alergické reakce jsou preformované molekuly uskladněné v intracelulárních váčcích: histamin (chemotaktický faktor eozinofilů), heparin a proteolytické enzymy. Sekundární mediátory se uvolňují s jistým zpožděním a to proto, že musí být teprve syntetizovány. Mezi sekundární mediátory řadíme prostaglandiny, cytokiny (IL-4, IL-5, faktor nekrotizující nádory alfa - TNF-α), leukotrieny, bradykinin, pomalu reagující substance anafylaxe (SRS-A), faktor aktivující krevní destičky (PAF) a další (Kumar *et al.* 2012). Tyto mediátory jsou

zodpovědné za primární a leckdy život ohrožující příznaky alergické reakce (anafylaktický šok): dilatace hladkých svalů, bronchokonstrikce, zvýšení permeability kapilár, lokální otok atd.

Pojem alergie se úzce spojuje s termínem atopie, často dokonce dochází k jejich záměně. Atopii definujeme jako genetickou predispozici k posunu imunitní odpovědi směrem k imunopatologické reakci I. typu. Alergie je pak vlastní klinickou manifestací této predispozice k rozvoji alergických onemocnění. Atopie tedy vyjadřuje dědičnou složku tohoto multifaktoriálního onemocnění, k jehož rozvoji přispívají ve velké míře i okolní vlivy. Hlavní současný problém, který má s alergiemi odborná veřejnost, reprezentuje neschopnost vysvětlit jejich vzrůstající incidenci, rozšíření a úmrtnost (D'Amato *et al.* 1994). Také interakce mezi genetickými a environmentálními faktory zůstává velkou neznámou. Mezi environmentální faktory se počítají vlivy prostředí během těhotenství: vystavení alergenům, stravování matky (Devereux *et al.* 2002), kouření (Noakes *et al.* 2006), mikrobiální infekce (Ege *et al.* 2006), ale i prostředí následného postnatálního vývoje. Tento fenomén popisuje stále platná tzv. hygienická hypotéza. Ta uvádí do souvislostí pečlivou čistotu domácností západního světa, kdy vyvíjející se imunitní systém dítěte nezískává z prostředí dostatečné spektrum antigenních stimulů, což neumožňuje jeho naivnímu imunitnímu systému aktivovat Th1 imunitní odpověď, která by mohla vybalancovat predispozici atopiků k Th2 nastavení imunitního systému. Tato hypotéza byla podpořena zjištěním, že nižší riziko rozvoje následného atopického onemocnění bylo pozorováno u dětí, které strávily rané dětství na farmě, kde byly vystaveny více než malému množství antigenních stimulů zejména mikrobiálního původu (Alfvén *et al.* 2006).

Právě tato pozorování vedla k rozvedení dané hypotézy a prověřování komponent přirozené imunity, zda nehrají roli při vývoji alergického onemocnění. Kontakt přirozené imunity s antigeny z vnějšího prostředí probíhá hlavně pomocí různých druhů evolučně konzervovaných receptorů (TLR), které jsou schopné vázat molekulární vzory asociované s mikroby (MAMP). Na tyto receptory se zaměřila skupina profesorky Prescott, která popsala rozdílné cytokinové odpovědi mezi skupinami alergických a nealergických dětí po stimulaci receptorů různými ligandy v různých fázích postnatálního vývoje. Imunitní systém nealergických dětí reagoval zvýšenou produkcí cytokinů (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10) pozitivně korelující s věkem dítěte ukazující na maturaci imunitního systému. Vyzrávání přirozené imunity korespondovalo s paralelním nárůstem produkce IFN- γ v reakci na alergeny a mitogeny a s tím související predominancí adaptivní Th1 imunitní odpovědi. Oproti tomu reakce přirozené imunity alergických dětí se vyznačuje přehnanou reaktivitou při narození, nicméně velkým útlumem s věkem, což zabraňuje správnému vyzrávání Th1 imunitní odpovědi a propagaci Th2. (Tulic *et al.* 2011) V návaznosti na tuto informaci jiná studie ukazuje, že receptor TLR4, který slouží primárně k rozpoznávání lipopolysacharidu (LPS) přítomného v buněčných stěnách gramnegativních (G-) bakterií, je schopný promiskuitně vázat i strukturně homologní alergeny

(alergen roztoče Der p 2) (Trompette *et al.* 2009). Souhrnně tato fakta poukazují na důležitost složek přirozené imunity pro rozvoj alergií a tím je dostávají do popředí zájmu mimo jiné také genetiků. Ti identifikovali velké množství genů, jejichž polymorfismus by mohl mít vliv na pozdější rozvoj atopie: geny pro vysokoafinní receptor pro LPS (CD14), IL-3, IL-4, IL-13, faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF), β -podjednotku IgE receptoru, MHCII, IFN- γ , T-buněčný receptor (TCR) (Denham *et al.* 2008).

Další palčivou otázkou pro genetiky je míra vlivu dědičnosti atopie ze strany matky versus otce. Zde se objevují dva názory. Studie Litonjua *et al.* (1998) ukazuje, že atopický stav matky má signifikantně vyšší vliv na rozvoj astmatu u 3,5 roku starých dětí. Tento fenomén je vysvětlitelný vývojem plodu v děloze matky, koexistencí krevních oběhů a pronikáním složek matčina imunitního systému do oběhu plodu přes placentu během závěrečné fáze těhotenství apod. Druhý názor prezentuje závislost míry dědičnosti na pohlaví dítěte. Tato dlouhodobá studie na téměř 1500 jedincích od narození do 18 let věku signifikantně propojuje dědičnost z mateřské strany pro ženské potomky a z otcovské strany pro mužské potomky (Arshad *et al.* 2012).

Těhotenství se popisuje jako stav organismu, který je z imunologického hlediska specifický preferenčním nastavením směrem k Th2 imunitní odpovědi. Podílí se na tom několik rozličných mechanismů: přechodné snížení kapacity buněčně zprostředkované imunity (Weinberg, 1984), zvýšená produkce protilátek a s tím spojená převaha Th2 cytokinů na maternofetálním rozhraní (Wegmann *et al.* 1993; Jones *et al.* 1997). Tato disbalance spolu s dalšími regulačními mechanismy (hormonální změny, anatomické bariéry, omezení antigenní charakteristiky plodu apod.) umožňují zajistit toleranci pro tělo semialogenního plodu v děloze matky. (Racicot *et al.* 2014)

Z hlediska alergologické problematiky se nabízí otázka, zda existuje rozdíl v posunu směrem k Th2 imunitní odpovědi mezi alergickými a zdravými matkami. Kdyby se prokázal rozdíl v nastavení imunitního systému (molekulární mechanismy spojené s genetickou predispozicí, reakce imunitního systému na alergen) během těhotenství u alergických matek, mohl by ten potenciálně mít vliv i na vyvíjející se plod. Nicméně tato domněnka byla vyvrácena E. G. Barrettem (2008).

Nezanedbatelnou roli v nastavení nezralého imunitního systému novorozence hraje způsob porodu. Při průchodu porodními cestami dochází totiž ke kolonizaci sliznic novorozence mateřskou mikrobiotou, což má benefiční efekt pro jejich ochranu před potenciálně patogenními vnějšími vlivy. Bylo popsáno, že při porodu císařským řezem dochází u novorozenců ženského pohlaví k šedesátiprocentnímu zvýšení rizika následného rozvoje alergického zánětu spojivek a astmatu. U dětí porozených císařským řezem probíhá kolonizace mikroorganismy později a jejich spektrum zastoupení je odlišné. (Renz-Polster *et al.* 2005; Nance *et al.* 2020)

V současné době se v popředí zájmu vědecké obce stále více objevuje fenomén role mikrobioty při regulaci imunitního systému. Vzhledem k osídlení sliznic lidského těla masou těchto organismů ve srovnatelném množství s počtem buněk lidského těla je jejich zapojení do procesu interakce slizničního imunitního systému s vlivy okolí nasnadě. Jejich role při zpracování potravy a zisku živin již byla popsána. Nicméně rozvoj technik genového sekvenování a bioinformatiky umožňuje současný boom v pozorování změny zastoupení jednotlivých mikrobiálních populací při rozličných onemocněních (idiopatické střevní záněty, syndrom dráždivého střeva, diabetes, obezita, alergie...). Popsání těchto změn a jejich pochopení by mohlo vést k použití poznatků o specifickém složení mikrobiálních populací jako prediktivního znaku rozvoje chorob a správnou intervencí k jejich potlačení v rané fázi (Maslowski and Mackay 2011; Faith *et al.* 2011; Belizário and Napolitano 2015; Belizário and Faintuch 2018). Probíhá intenzivní výzkum diverzity střevní mikrobioty v souvislosti s možností jejího použití jako predispozičního znaku v rozvoji alergie. Recentní výsledky vypadají velmi slibně, ačkoliv celý koncept je teprve na svém začátku. (Conroy *et al.* 2009; Azad *et al.* 2015; Pascal *et al.* 2018; Musso *et al.* 2019; Peroni *et al.* 2020; Galazzo *et al.* 2020; Nance *et al.* 2020).

ALERGICKÝ STAV MATKY NEMÁ VLIV NA ODPOVĚĎ NOVOROZENECKÉHO IMUNITNÍHO SYSTÉMU NA STIMULACI ALERGENY (*IN VITRO*)

(Lohonková *et al.* 2019)

Dlouhodobý růst incidence alergických onemocnění, který lze sledovat v průběhu posledních desetiletí, vyvíjí tlak na stanovení vhodného prognostického znaku pro podchycení rozvoje alergie již ideálně před prvními klinickými příznaky (Platts-Mills 2015). Ruku v ruce s rozšířením atopických onemocnění stoupají i finanční a sociální náklady na léčbu, respektive potlačení projevů alergických onemocnění. Jako nejideálnější strategie se nabízí zavedení primární prevence. Protože je ale alergie multifaktoriální onemocnění s mnoha faktory ovlivňujícími její etiologii, není tato cesta jednoduchá. Již mnoho let hledají skupiny vědců z celého světa ideální znak, podle kterého by pozdější nástup alergie šlo předvídat: zvýšená hladina IgE v pupečnickové krvi (Prokešová *et al.* 2008; Peters *et al.* 2012), vyšší zastoupení Th2 cytokinů (Fu *et al.* 2013; Hrdý *et al.* 2018), porucha imunoregulace (Hrdý *et al.* 2012; Černý *et al.* 2018), zvýšená reaktivita buněk pupečnickové krve (Žižka *et al.* 2007), komponenty mateřského mléka, které podporují nástup alergie (Böttcher *et al.* 2000). Nejspolehlivějším predikčním faktorem ale stále zůstává alergický stav matky (Wang *et al.* 2005; Prescott *et al.* 2003; Stabell *et al.* 2004; STEINKE *et al.* 2008).

Klíčovým faktorem k nalezení ideálního prognostického znaku je pochopení imunologického pozadí dějů v pozdní fázi těhotenství, během porodu a v raném postnatálním období. V tomto časovém rámci se nezralý imunitní systém setkává s širokým spektrem mikrobiálních stimulů, které napomáhají jeho maturaci a v případě neadekvátního složení mikrobioty může dojít k eventuálnímu posunu imunitních reakcí směrem k propuknutí alergického onemocnění. Teorie rané senzibilizace fetálního imunitního systému stojí na jeho popsané interakci s mikroby a průniku alergenů přes placentu, což umožňuje primární nastavení imunitní odpovědi *in utero* (Loibichler *et al.* 2002; Vance *et al.* 2005). Novorozený organismus by podle této hypotézy měl být nejen senzibilizovaný, ale dle posunu imunitní odpovědi během těhotenství směrem k Th2 také preferovat tento typ reakce. Na podporu tohoto byla popsána zvýšená reaktivita buněk pupečnickové nebo periferní krve po stimulaci alergenů u dětí alergických matek ve srovnání s těmi zdravými (Contreras *et al.* 2003; Fu *et al.* 2013). Nicméně byly prezentovány i naprosto opačné výsledky, podle kterých by nastíněná hypotéza musela být zamítnuta (Rindsjö *et al.* 2009; Kim *et al.* 2012).

Cytokiny hrají klíčovou roli při nastavování polarizace imunitní odpovědi na daný antigen. Celá kaskáda začíná vystavením antigenu APC a rozpoznání daného epitopu receptorem TCR na naivní T buňce. Právě spektrum a koncentrace jednotlivých cytokinů v imunologické

synapsi jsou jedním z rozhodujících faktorů následné polarizace imunitní odpovědi směrem k Th1, Th2, Th17 nebo Treg. Typické cytokiny pro Th1 jsou IL-2, IL-12, IFN- γ a TNF- α . Th2 podporující cytokiny jsou IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25 a IL-33. Pro Th17 jsou charakteristické cytokiny IL-17A, IL-17F a IL-22. Cytokiny mající funkci v Treg odpovědi jsou IL-10, IL-35 a TGF- β .

Předchozí výzkum v naší laboratoři popisuje vyšší odpovídavost mononukleárních buněk pupečnickové krve (CBMC) dětí alergických matek ve srovnání s dětmi zdravých matek při použití polyklonálního aktivátoru (Žižka *et al.* 2007). Testovanou teorií je tedy možnost rozdílné reaktivity CBMC dvou skupin dětí, kdy buňky dětí s relativně vyšším rizikem rozvoje následné alergie a tedy porušenou rovnováhou regulace imunitní odpovědi by mohly na relativně neškodný antigen – alergen reagovat odlišně ve srovnání s CBMC dětí s nízkou očekávanou incidencí následné alergie. Abychom navrženou hypotézu otestovali, obě skupiny CBMC (CBMC získané z pupečnickové krve 53 dětí alergických versus zdravých matek) jsme stimulovali alergeny: ovalbuminem (proteinem vaječného bílku), rekombinantním pylem z břízy bělokore *Betula verrucosa* (rBet v 1), pylem z trávy bojínku lučního *Phleum pratense* (nPhl p 5) a rekombinantními fragmenty roztoče prachového *Dermatophagoides pteronyssinus* (rDer p 2). Buněčnou reaktivitu jsme hodnotili pomocí stanovení genové exprese cytokinů (qRT-PCR) a koncentrace produkovaných cytokinů IL-5, IL-10, IL-13 a IFN- γ v supernatantu buněčných kultur (ELISA).

Rozdílná odpovídavost na jakékoli sledované úrovni by mohla sloužit jako prognostický znak ukazující na vyšší riziko následného rozvoje alergie. Nicméně naše výsledky nepopisují žádný signifikantní rozdíl v produkci cytokinů ani při hodnocení genové exprese, ani při stanovení produkované koncentrace signálních proteinů mezi skupinami dětí zdravých a alergických matek. Jediný rozdíl se nám podařilo zaznamenat v produkci IL-5, kdy skupina dětí alergických matek měla jeho vyšší koncentraci v supernatantu buněčných kultur, ale toto pozorování bylo učiněno po stimulaci kontrolním polyklonálním stimulátorem fytohemaglutininem (PHA).

Na rozvoji alergického fenotypu, který se může propagovat relativně velmi časně postnatálně, se podílí široká škála faktorů (mikrobiální kolonizace, způsob porodu, vlivy prostředí, typ kojení). I proto existuje urputná snaha o nalezení a popsání možného znaku, který by ukazoval na zvýšenou pravděpodobnost rozvoje alergického onemocnění a jehož zachycení by umožnilo nasadit preventivní opatření ještě před tímto propuknutím. V tuto chvíli se stále jako nejspolehlivější ukazuje atopický statut matky (Liu *et al.* 2003; Moore *et al.* 2004; Schaub *et al.* 2005). V návaznosti na genetickou povahu tohoto pozorování byly jako další potenciální faktory hrající roli v pozdějším rozvoji alergie navrženy okolnosti provázející intrauterinní vývoj jedince

a zejména jeho imunitního systému (Jones *et al.* 2000). Jako nejslibnější se stále jeví nitroděložní alergická senzibilizace nezralého imunitního systému, která by mohla být rozhodujícím článkem v porušení rovnováhy jeho následného vývoje na podkladu genetické predispozice.

Několik publikovaných prací je v rozporu s naším zjištěním. Popisují cytokinové vzory spojené s následným rozvojem astmatu u dětí (Rothers *et al.* 2011); dokonce nižší hladinu IFN- γ a vyšší IL-13 po stimulaci alergenem asociovanou s rozvojem alergie (Contreras *et al.* 2003). My ale tyto výsledky nemůžeme podpořit, protože jsme podobné rozdíly nepozorovali, stejně jako Kim *et al.* (2012). Naše skupina dříve popsala narušenou funkci Treg buněk u skupiny s vyšším rizikem budoucího rozvoje alergie (Hrdý *et al.* 2012; Černý *et al.* 2018). Konkrétně nižší hladiny IL-10 byly považovány za slibný znak vyššího rizika následného propuknutí choroby (Súkeníková *et al.* 2017; Suzuki *et al.* 2018).

Popsaná vyšší proliferační aktivita buněk pupečnickové krve po stimulaci alergenem (Kim *et al.* 2012) nás vedla k myšlence použít ve studii dvě metodiky sledování tvorby cytokinů: genovou expresi a následnou produkci proteinu. Naše výsledky souhrnně ukazují na velmi slabou odpovídatost CBMC na stimulaci alergeny. Tedy se zdá, že jedinci v naší studii nebyli sensibilizováni alergeny *in utero*. Nicméně ani po kultivaci s polyklonárním stimulem PHA jsme nepozorovali signifikantní rozdíl mezi skupinami, ačkoliv tam byl zatelný trend k vyšší produkci cytokinů buňkami dětí alergických matek. Toto ukazuje na možnost, že imunitní systém je spíše nastaven ke zvýšené reaktivitě vedoucí potenciálně až k poruše regulace imunitní odpovědi na relativně neškodné alergeny prostředí a následnému rozvoji alergického onemocnění.

Současne jsme si vědomi limitů naší studie, které spočívají hlavně v relativně úzkém spektru sledovaných cytokinů a poměrně malé kohortě zahrnutých jedinců vzhledem k velkým individuálním rozdílům. Bylo by například zajímavé zahrnout další Th2 cytokiny hrající roli v rozvoji alergií (například IL-4, IL-25, IL-33) nebo naopak ve snížení proalergických imunitních odpovědí (například IL-35, TGF- β). Také jsme poněkud opomenuli cytokiny podporující Th9, Th17, Th22 a přirozené lymfoidní buňky druhého typu (ILC2). Naše výsledky každopádně naznačují, že perinatální senzibilizace nejspíše nehraje rozhodující roli pro rozvoj alergií a že bude třeba zaměřit pozornost na nalezení prognostického znaku jiným směrem.

ZÁVĚR

Alergická onemocnění jsou v hledáčku vědecké obce již přes 100 let. Alarmující je zejména jejich neustále narůstající incidence, která nemá jasné vysvětlení. Vzhledem k multifaktorialitě této choroby se ukazuje jako vhodná časná intervence po nalezení prognostického znaku, který by spolehlivě poukazoval na následný rozvoj alergie. Popsání takového znaku nebo skupiny znaků by umožnilo následné zavedení včasných preventivních opatření (např. podávání probiotik apod.), které by zabránilo propuknutí samotné choroby. Ačkoliv skupiny vědců prověřují různé varianty, nejspolehlivější se stále jeví maternální dědičnost. Ostatní možnosti byly zatím pokaždé zpochybněny.

Ani velmi slibná varianta intrauterinní perinatální senzibilizace alergenů se neukázala být vhodným kandidátem na tento prediktivní znak. Ovšem možná následná korelace reaktivity CBMC v odpovědi na dané alergenů se skutečným výskytem alergií u dětí v pozdějším věku by mohla přinést další odpovědi a třeba dát vznik novým hypotézám. Každopádně přístupů k této problematice je vzhledem k množství vlivů na incidenci alergií opravdu značné množství, takže pokud nepřinesl očekávané výsledky tento výzkum, podaří se to jistě jinému.

LITERATURA

Alfvén T., C. Braun-Fahrlander, B. Brunekreef, E. Von Mutius, J. Riedler, *et al.*, 2006 Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle - The PARSIFAL study. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 61: 414–421. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00939.x>

Arshad S. H., W. Karmaus, A. Raza, R. J. Kurukulaaratchy, S. M. Matthews, *et al.*, 2012 The effect of parental allergy on childhood allergic diseases depends on the sex of the child. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.03.042>

Azad M. B., T. Konya, D. S. Guttman, C. J. Field, M. R. Sears, *et al.*, 2015 Infant gut microbiota and food sensitization: Associations in the first year of life. *Clin. Exp. Allergy* 45: 632–643. <https://doi.org/10.1111/cea.12487>

Barrett E. G., 2008 Maternal influence in the transmission of asthma susceptibility. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 21: 474–484. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2007.06.005>

Belizário J. E., and M. Napolitano, 2015 Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Front. Microbiol.* 6: 1050.

Belizário J. E., and J. Faintuch, 2018 Microbiome and Gut Dysbiosis. *Exp. Suppl.* 109: 459–476. https://doi.org/10.1007/978-3-319-74932-7_13

Böttcher M. F., M. C. Jenmalm, R. P. Garofalo, and B. Björkstén, 2000 Cytokines in breast milk from allergic and nonallergic mothers. *Pediatr. Res.* 47: 157–162. <https://doi.org/10.1203/00006450-200001000-00026>

Černý V., J. Hrdý, O. Novotná, P. Petrásková, K. Boráková, *et al.*, 2018 Distinct characteristics of Tregs of newborns of healthy and allergic mothers, (S. Suvas, Ed.). *PLoS One* 13: e0207998. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207998>

Conroy M. E., H. N. Shi, and W. A. Walker, 2009 The long-term health effects of neonatal microbial flora. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 9: 197–201. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32832b3f1d>

Contreras J. P., N. P. Ly, D. R. Gold, H. He, M. Wand, *et al.*, 2003 Allergen-induced cytokine production, atopic disease, IgE, and wheeze in children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112: 1072–1077. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.08.036>

D'Amato G., G. Liccardi, and M. D'Amato, 1994 Environment and development of respiratory allergy. II. Indoors. *Monaldi Arch. Chest Dis.* 49: 412–420.

- Denham S., G. H. Koppelman, J. Blakey, M. Wjst, M. A. Ferreira, *et al.*, 2008 Meta-analysis of genome-wide linkage studies of asthma and related traits. *Respir. Res.* 9: 38. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-9-38>
- Devereux G., R. N. Barker, and A. Seaton, 2002 Antenatal determinants of neonatal immune responses to allergens. *Clin. Exp. Allergy* 32: 43–50. <https://doi.org/10.1046/j.0022-0477.2001.01267.x>
- ED W., 1984 Pregnancy-associated Depression of Cell-Mediated Immunity. *Rev. Infect. Dis.* 6. <https://doi.org/10.1093/CLINIDS/6.6.814>
- Ege M. J., C. Bieli, R. Frei, R. T. van Strien, J. Riedler, *et al.*, 2006 Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117: 817–823. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.12.1307>
- Faith J. J., N. P. McNulty, F. E. Rey, and J. I. Gordon, 2011 Predicting a human gut microbiota's response to diet in gnotobiotic mice. *Science* 333: 101–4. <https://doi.org/10.1126/science.1206025>
- Fu Y., H. Lou, C. Wang, W. Lou, Y. Wang, *et al.*, 2013 T cell subsets in cord blood are influenced by maternal allergy and associated with atopic dermatitis. *Pediatr. Allergy Immunol.* 24: 178–186. <https://doi.org/10.1111/pai.12050>
- Galazzo G., N. van Best, L. Bervoets, I. O. Dapaah, P. H. Savelkoul, *et al.*, 2020 Development of the Microbiota and Associations With Birth Mode, Diet, and Atopic Disorders in a Longitudinal Analysis of Stool Samples, Collected From Infancy Through Early Childhood. *Gastroenterology* 158: 1584–1596. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.01.024>
- Gould H. J., and B. J. Sutton, 2008 IgE in allergy and asthma today. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 205–217.
- Hrdý J., I. Kocourková, and L. Prokešová, 2012 Impaired function of regulatory T cells in cord blood of children of allergic mothers. *Clin. Exp. Immunol.* 170: 10–17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04630.x>
- Hrdý J., K. Vlasáková, V. Černý, L. Súkeníková, O. Novotná, *et al.*, 2018 Decreased allergy incidence in children supplemented with *E. coli* O83:K24:H31 and its possible modes of action. *Eur. J. Immunol.* 48: 2015–2030. <https://doi.org/10.1002/eji.201847636>
- Hübner M. P., D. Larson, M. N. Torrero, E. Mueller, Y. Shi, *et al.*, 2011 Anti-FcεR1 antibody

injections activate basophils and mast cells and delay Type 1 diabetes onset in NOD mice. *Clin. Immunol.* 141: 205–217. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2011.08.004>

Jackson M., 2001 Allergy: The making of a modern plague. *Clin. Exp. Allergy* 31: 1665–1671.

Jones C. A., J. J. Finlay-Jones, and P. H. Hart, 1997 *Type-1 and Type-2 Cytokines in Human Late-Gestation Decidual Tissue*.

Jones C. A., J. A. Holloway, and J. O. Warner, 2000 Does atopic disease start in foetal life? *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*

Kaiko G. E., J. C. Horvat, K. W. Beagley, and P. M. Hansbro, 2008 Immunological decision-making: How does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123: 326–338.

Kim H. Bin, K. M. Ahn, K. W. Kim, Y. H. Shin, J. Yu, *et al.*, 2012 Cord blood cellular proliferative response as a predictive factor for atopic dermatitis at 12 months. *J. Korean Med. Sci.* 27: 1320–1326. <https://doi.org/10.3346/jkms.2012.27.11.1320>

Kumar S., A. K. Verma, M. Das, and P. D. Dwivedi, 2012 Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy. *Int. Immunopharmacol.* 13: 432–439.

Litonjua A. A., V. J. Carey, H. A. Burge, S. T. Weiss, and D. R. Gold, 1998 Parental history and the risk for childhood asthma: Does mother confer more risk than father? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158: 176–181. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.158.1.9710014>

Liu C. A., C. L. Wang, H. Chuang, C. Y. Ou, T. Y. Hsu, *et al.*, 2003 Prenatal prediction of infant atopy by maternal but not paternal total IgE levels. *J. Allergy Clin. Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.08.030>

Lohonková A., O. Novotná, P. Petrásková, K. Boráková, L. Prokešová, *et al.*, 2019 Maternal Allergy Status Has No Impact on Neonatal Immune Responses to Allergen Stimuli. *Folia Biol. (Praha)*. 65: 221–226.

Loibichler C., J. Pichler, M. Gerstmayr, B. Bohle, H. Kiss, *et al.*, 2002 Materno-fetal passage of nutritive and inhalant allergens across placentas of term and pre-term deliveries perfused in vitro. *Clin. Exp. Allergy* 32: 1546–1551. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2002.01479.x>

Lorenz M., S. Jung, and A. Radbruch, 1995 Switch transcripts in immunoglobulin class switching. *Science* (80-.). 267: 1825–1828. <https://doi.org/10.1126/science.7892607>

Maslowski K. M., and C. R. Mackay, 2011 Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat.*

Immunol. 12: 5–9. <https://doi.org/10.1038/ni0111-5>

Moore M. M., S. L. Rifas-Shiman, J. W. Rich-Edwards, K. P. Kleinman, C. A. Camargo, *et al.*, 2004 Perinatal Predictors of Atopic Dermatitis Occurring in the First Six Months of Life. *Pediatrics*. <https://doi.org/10.1542/peds.113.3.468>

Morelli A. E., A. T. Larregina, W. J. Shufesky, M. L. G. Sullivan, D. B. Stolz, *et al.*, 2004 Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104: 3257–3266. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0824>

Musso P., E. Chiappini, and R. Bernardini, 2019 Human microbiome and allergic diseases in children: pathogenetic role and therapeutic options. *Curr. Pediatr. Rev.* 15. <https://doi.org/10.2174/1573396315666191025110849>

Nance C. L., R. Deniskin, V. C. Diaz, M. Paul, S. Anvari, *et al.*, 2020 The Role of the Microbiome in Food Allergy: A Review. *Children* 7: 50. <https://doi.org/10.3390/children7060050>

Noakes P. S., J. Hale, R. Thomas, C. Lane, S. G. Devadason, *et al.*, 2006 Maternal smoking is associated with impaired neonatal toll-like-receptor-mediated immune responses. *Eur. Respir. J.* 28: 721–729. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00050206>

Pascal M., M. Perez-Gordo, T. Caballero, M. M. Escribese, M. N. Lopez Longo, *et al.*, 2018 Microbiome and allergic diseases. *Front. Immunol.* 9.

Peroni D. G., G. Nuzzi, I. Trambusti, M. E. Di Cicco, and P. Comberiati, 2020 Microbiome Composition and Its Impact on the Development of Allergic Diseases. *Front. Immunol.* 11.

Peters J. L., S. Cohen, J. Staudenmayer, J. Hosen, T. A. E. Platts-Mills, *et al.*, 2012 Prenatal negative life events increases cord blood IgE: Interactions with dust mite allergen and maternal atopy. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 67: 545–551. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02791.x>

Platts-Mills T. A. E., 2015 The allergy epidemics: 1870-2010. *J. Allergy Clin. Immunol.* 136: 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.03.048>

Prescott S. L., B. King, T. L. Strong, and P. G. Holt, 2003 The value of perinatal immune responses in predicting allergic disease at 6 years of age. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 58: 1187–1194. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2003.00263.x>

Prokešová L., O. Novotná, I. Janatková, P. Zanvit, J. Žižka, *et al.*, 2008 IgE against food and respiratory allergens in healthy and allergic mothers and their children. *Folia Microbiol. (Praha)*. 53: 67–72. <https://doi.org/10.1007/s12223-008-0010-5>

- Racicot K., J. Y. Kwon, P. Aldo, M. Silasi, and G. Mor, 2014 Understanding the complexity of the immune system during pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 72: 107–116.
- Renz-Polster H., M. R. David, A. S. Buist, W. M. Vollmer, E. A. O'Connor, *et al.*, 2005 Caesarean section delivery and the risk of allergic disorders in childhood. *Clin. Exp. Allergy* 35: 1466–1472. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2005.02356.x>
- Rindsjö E., M. Joerink, C. Johansson, K. Bremme, V. Malmström, *et al.*, 2009 Maternal allergic disease does not affect the phenotype of T and B cells or the immune response to allergens in neonates. *Allergy* 65: 822–830. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02266.x>
- Rothers J., M. Halonen, D. A. Stern, I. C. Lohman, S. Mobley, *et al.*, 2011 Adaptive cytokine production in early life differentially predicts total IgE levels and asthma through age 5 years. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128: 397-402.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.04.044>
- Schaub B., K. G. Tantisira, F. K. Gibbons, H. He, A. A. Litonjua, *et al.*, 2005 Fetal cord blood: aspects of heightened immune responses. *J. Clin. Immunol.* 25: 329–37. <https://doi.org/10.1007/s10875-005-4180-5>
- Silverstein A. M., 2001 History of Immunology, in *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Sokol C. L., N. Q. Chu, S. Yu, S. A. Nish, T. M. Laufer, *et al.*, 2009 Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat. Immunol.* 10: 713–720. <https://doi.org/10.1038/ni.1738>
- Stabell Benn C., J. Wohlfahrt, P. Aaby, T. Westergaard, E. Benfeldt, *et al.*, 2004 Breastfeeding and Risk of Atopic Dermatitis, by Parental History of Allergy, during the First 18 Months of Life. *Am J Epidemiol* *Am. J. Epidemiol.* 160: 217–223. <https://doi.org/10.1093/aje/kwh208>
- STEINKE J., S. RICH, and L. BORISH, 2008 5. Genetics of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121: S384–S387. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.07.029>
- Súkeníková L., V. Černý, O. Novotná, P. Petrásková, K. Boráková, *et al.*, 2017 Different capacity of in vitro generated myeloid dendritic cells of newborns of healthy and allergic mothers to respond to probiotic strain *E. coli* O83:K24:H31. *Immunol. Lett.* 189: 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.05.013>
- Suzuki S., E. Campos-Alberto, Y. Morita, M. Yamaguchi, T. Toshimitsu, *et al.*, 2018 Low Interleukin 10 Production at Birth Is a Risk Factor for Atopic Dermatitis in Neonates with *Bifidobacterium* Colonization. *Int. Arch. Allergy*

Immunol. 177: 342–349. <https://doi.org/10.1159/000492130>

Trompette A., S. Divanovic, A. Visintin, C. Blanchard, R. S. Hegde, *et al.*, 2009 Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature* 457: 585–588. <https://doi.org/10.1038/nature07548>

Tulic M. K., M. Hodder, A. Forsberg, S. McCarthy, T. Richman, *et al.*, 2011 Differences in innate immune function between allergic and nonallergic children: New insights into immune ontogeny. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127: 470–478.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.09.020>

Vance G. H. S., S. A. Lewis, K. E. C. Grimshaw, P. J. Wood, R. A. Briggs, *et al.*, 2005 Exposure of the fetus and infant to hens' egg ovalbumin via the placenta and breast milk in relation to maternal intake of dietary egg. *Clin. Exp. Allergy* 35: 1318–1326. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2005.02346.x>

Wang J.-Y., A. Cherry, G.-J. Lin, M. Shian, -Jy Bey, *et al.*, Discovery of genetic difference between asthmatic children with high IgE level and normal IgE level by whole genome linkage disequilibrium mapping using 763 autosomal STR markers. <https://doi.org/10.1007/s10038-005-0248-6>

Wang J., and M. A. Maldonado, 2006 *The Ubiquitin-Proteasome System and Its Role in Inflammatory and Autoimmune Diseases*.

Wegmann T. G., H. Lin, L. Guilbert, and T. R. Mosmann, 1993 Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol. Today* 14: 353–356.

Yamaoka A., I. Kuwabara, L. G. Frigeri, and F. T. Liu, 1995 A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. *J. Immunol.* 154.

Žižka J., J. Hrdý, R. Lodinová-Žádníková, I. Kocourková, O. Novotná, *et al.*, 2007 Effect of breast milk of healthy and allergic mothers on in vitro stimulation of cord blood lymphocytes. *Pediatr. Allergy Immunol.* 18: 486–494. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2007.00563.x>

PŘÍLOHY

1. Lohonková A., O. Novotná, P. Petrásková, K. Boráková, L. Prokešová, et al., 2019 Maternal Allergy Status Has No Impact on Neonatal Immune Responses to Allergen Stimuli. *Folia Biol. (Praha)*. 65: 221–226.